



(12) Translation of  
European patent specification

(11) NO/EP 2981607 B1

NORWAY

(19) NO  
(51) Int Cl.  
**C12N 5/0783 (2010.01)**  
**C12N 5/074 (2010.01)**

**Norwegian Industrial Property Office**

---

(45) Translation Published 2021.01.18

(80) Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent 2020.08.19

(86) European Application Nr. 14722926.4

(86) European Filing Date 2014.04.03

(87) The European Application's Publication Date 2016.02.10

(30) Priority 2013.04.03, US, 201361808092 P  
2013.04.05, US, 201361808992 P

(84) Designated Contracting States: AL ; AT ; BE ; BG ; CH ; CY ; CZ ; DE ; DK ; EE ; ES ; FI ; FR ; GB ; GR ; HR ; HU ; IE ; IS ; IT ; LI ; LT ; LU ; LV ; MC ; MK ; MT ; NL ; NO ; PL ; PT ; RO ; RS ; SE ; SI ; SK ; SM ; TR

(73) Proprietor Memorial Sloan Kettering Cancer Center, 1275 York Avenue, New York, NY 10065, USA

(72) Inventor THEMELI, Maria, 475 Main St., New York, NY 10044, USA  
SADELAIN, Michel, 444 Central Park West Apt. 8H, New York, NY 10025, USA  
KLOSS, Christopher C., 1703 Wallace St. Apt. 102, Philadelphia, PA 19130, USA

(74) Agent or Attorney CURO AS, Vestre Rosten 81, 7075 TILLER, Norge

---

(54) Title **EFFECTIVE GENERATION OF TUMOR-TARGETED T-CELLS DERIVED FROM PLURIPOTENT STEM CELLS**

(56) References Cited:  
US-A1- 2013 071 414  
US-A1- 2004 067 583  
WO-A2-2009/091826  
WO-A1-2013/163171  
US-A1- 2013 078 226  
WO-A2-2012/012667  
WO-A1-2013/176916  
WO-A1-2009/097140  
US-A1- 2004 171 148  
David Arthur Knorr ET AL: "ENGINEERING HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS FOR ENHANCED LYMPHOCYTE DEVELOPMENT AND FUNCTION A DISSERTATION SUBMITTED TO THE FACULTY OF THE GRADUATE SCHOOL OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA BY", , 1 October 2012 (2012-10-01), XP055218241, Retrieved from the Internet: URL:[http://conservancy.umn.edu/bitstream/handle/11299/142741/Knorr\\_umn\\_0130E\\_13251.p](http://conservancy.umn.edu/bitstream/handle/11299/142741/Knorr_umn_0130E_13251.p)

df?sequence=1&isAllowed=y [retrieved on 2015-10-05]

DAVID A. KNORR ET AL: "Pluripotent stem cell-derived natural killer cells for cancer therapy", *TRANSLATIONAL RESEARCH*, vol. 156, no. 3, 1 September 2010 (2010-09-01), pages 147-154, XP055067591, ISSN: 1931-5244, DOI: 10.1016/j.trsl.2010.07.008 cited in the application  
 SCHMITT T M ET AL: "Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by Delta-like-1 in vitro", *IMMUNITY, CELL PRESS, US*, vol. 17, no. 6, 1 December 2002 (2002-12-01), pages 749-756, XP002338760, ISSN: 1074-7613, DOI: 10.1016/S1074-7613(02)00474-0 cited in the application

M. SADELAIN ET AL: "The Basic Principles of Chimeric Antigen Receptor Design", *CANCER DISCOVERY*, vol. 3, no. 4, 1 April 2013 (2013-04-01), pages 388-398, XP055133523, ISSN: 2159-8274, DOI: 10.1158/2159-8290.CD-12-0548 cited in the application

CARLOS A RAMOS ET AL: "Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered lymphocytes for cancer therapy", *EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY*, vol. 11, no. 7, 1 July 2011 (2011-07-01), pages 855-873, XP055122639, ISSN: 1471-2598, DOI: 10.1517/14712598.2011.573476

MIN CHENG ET AL: "NK cell -based immunotherapy for malignant diseases", *CELLULAR & MOLECULAR IMMUNOLOGY*, vol. 10, no. 3, 1 May 2013 (2013-05-01), pages 230-252, XP055143580, ISSN: 1672-7681, DOI: 10.1038/cmi.2013.10

DAVID L. PORTER ET AL: "Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia", *NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE*, vol. 365, no. 8, 25 August 2011 (2011-08-25), pages 725-733, XP055052475, ISSN: 0028-4793, DOI: 10.1056/NEJMoa1103849

SADELAIN M ET AL: "The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors", *CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, ELSEVIER, OXFORD, GB*, vol. 21, no. 2, 1 April 2009 (2009-04-01), pages 215-223, XP026058399, ISSN: 0952-7915, DOI: 10.1016/J.COI.2009.02.009 [retrieved on 2009-03-25]

MARIA THEMELI ET AL: "Generation of tumor -targeted human T lymphocytes from induced pluripotent stem cells for cancer therapy", *NATURE BIOTECHNOLOGY*, vol. 31, no. 10, 11 August 2013 (2013-08-11), pages 928-933, XP055143283, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.2678

SINGH H ET AL: "Naïve Cd19 -Specific T Cells Exhibit Superior Proliferation and Potential for Adoptive Immunotherapy", *BIOLOGY OF BLOOD AND MARROW TRANSPLANTATION*, vol. 18, no. 2, 1 February 2012 (2012-02-01), XP028883501, ISSN: 1083-8791, DOI: 10.1016/J.BBMT.2011.12.276

KOWOLIK C M ET AL: "Costimulation Provided through a CD19-Specific Chimeric Immunoreceptor Enhances in vivo Persistence and Anti-Tumor Efficacy of Adoptively Transferred T Cells", *BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US*, vol. 106, no. 11, Part 1, 16 November 2005 (2005-11-16), page 372a, XP009130374, ISSN: 0006-4971

Gianpietro Dotti ET AL: "Review Fifteen Years of Gene Therapy Based on Chimeric Antigen Receptors: "Are We Nearly There Yet?"" , 1 November 2009 (2009-11-01), XP055122213, Retrieved from the Internet: URL:<http://online.liebertpub.com/doi/pdf/10.1089/hum.2009.142> [retrieved on 2014-06-06]

H. TORIKAI ET AL: "A foundation for universal T-cell based immunotherapy: T cells engineered to express a CD19-specific chimeric-antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR", *BLOOD*, vol. 119, no. 24, 14 June 2012 (2012-06-14), pages 5697-5705, XP055071623, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2012-01-405365

B. JENA ET AL: "Redirecting T -cell specificity by introducing a tumor -specific chimeric antigen receptor", *BLOOD*, vol. 116, no. 7, 19 August 2010 (2010-08-19), pages 1035-1044, XP055021403, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2010-01-043737

MARTHA LUEVANO ET AL: "Generation of natural killer cells from hematopoietic stem cells in vitro for immunotherapy", *CELLULAR & MOLECULAR IMMUNOLOGY*, vol. 9, no. 4, 1 July 2012 (2012-07-01), pages 310-320, XP055143633, ISSN: 1672-7681, DOI: 10.1038/cmi.2012.17

RENIER BRENTJENS ET AL: "Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia With Genetically Targeted Autologous T Cells: Case Report of an Unforeseen Adverse Event in a Phase I Clinical Trial", *MOLECULAR THERAPY*, vol. 18, no. 4, 1 April 2010 (2010-04-01), pages 666-668, XP055143817, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2010.31

SCHMITT T M ET AL: "Induction of T cell development and establishment of T cell competence from embryonic stem cells differentiated in vitro", *NATURE IMMUNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, GB*, vol. 5, no. 4, 1 April 2004 (2004-04-01), pages 410-417, XP002338759, ISSN: 1529-2908, DOI: 10.1038/NI1055

TOSHINOBU NISHIMURA ET AL: "Generation of Rejuvenated Antigen-Specific T Cells by Reprogramming to Pluripotency and Redifferentiation", *CELL STEM CELL*, vol. 12, no. 1, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 114-126, XP055218131, ISSN: 1934-5909, DOI:

10.1016/j.stem.2012.11.002

HANS G. KLINGEMANN: "Cellular therapy of cancer with natural killer cells-where do we stand?", CYTOTHERAPY, vol. 15, no. 10, 1 October 2013 (2013-10-01), pages 1185-1194, XP055143808, ISSN: 1465-3249, DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.03.011

Enclosed is a translation of the patent claims in Norwegian. Please note that as per the Norwegian Patents Acts, section 66i the patent will receive protection in Norway only as far as there is agreement between the translation and the language of the application/patent granted at the EPO. In matters concerning the validity of the patent, language of the application/patent granted at the EPO will be used as the basis for the decision. The patent documents published by the EPO are available through Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com>) or via the search engine on our website here: <https://search.patentstyret.no/>

**Patentkrav**

1. Pluripotent stamcelle som omfatter en rearrangert T-cellereseptor (TCR)-lokasjon og som omfatter en nukleinsyre som koder for en kimær antigenreseptor (CAR), hvori den pluripotente stamcellen er avledet fra en T-celle.
- 5 2. Celle ifølge krav 1, hvori den pluripotente stamcellen er transdusert med nukleinsyren som koder for nevnte CAR.
3. Celle ifølge krav 1, hvori den pluripotente stamcellen ikke uttrykker TCR på celleoverflaten.
4. Celle ifølge ett av kravene 1-3, hvori nevnte CAR binder til et tumorantigen.
5. Celle ifølge krav 4, hvori nevnte tumorantigen er valgt fra gruppen bestående av karbonanhydrase  
10 IX (CA1X), karsinoembryonisk antigen (CEA), CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD123, CD133, CD138, et antigen med en cytomegalovirus- (CMV)-infiltrert celle (for eksempel, et celleoverflate-antigen), epitel-glycoprotein2 (EGP 2), epitel-glycoprotein-40 (EGP-40), epitel-celleadhesjonsmolekyl (EpCAM), reseptor tyrosin-proteinkinaser erb-B2,3,4, folatbindende protein (FBP), føtal acetylcholin-reseptor (AChR), folat reseptor-a,  
15 Gangliosid G2 (GD2), Gangliosid G3 (GD3), human epidermal vekstfaktor Reseptor 2 (HER-2), human telomerase reversert transkriptase (hTERT), Interleukin-13 reseptor-underenhet alfa-2 (IL-13R $\alpha$ 2),  $\kappa$ -lett kjede, kinaseinnsatsdomenereseptor (KDR), Lewis A (CA19,9), Lewis Y (LeY), L1 celleadhesjonsmolekyl (L1CAM), melanom antigenfamilie A, 1 (MAGE-A1), Mucin 16 (Muc-16), Mucin 1 (Muc-1), Mesothelin (MSLN), NKG2D-ligander, kreft-testisantigen NY-ESO-1, onkofetalt  
20 antigen (h5T4), prostatastamcelleantigen (PSCA), prostata-spesifikt membranantigen (PSMA), tumor- assosiert glycoprotein 72 (TAG-72), vaskulær endotel vekstfaktor R2 (VEGF- R2), og Wilms tumorprotein (WT-1).
6. Celle ifølge krav 4 eller krav 5, hvori tumorantigenet er CD19.
7. Framgangsmåte for framstilling av en pluripotent stamcelle (PSC) som bærer en rearrangert T-  
25 cellereseptor (TCR)-lokasjon og som omfatter en nukleinsyre som koder for en kimær antigenreseptor (CAR), hvilken framgangsmåte omfatter å,
  - a) framskaffe,
    - i) en pluripotent stamcelle som bærer en rearrangert TCR-lokasjon (T-PSC), hvori den pluripotente stamcellen er avledet fra en T-celle, og  
30 ii) en CAR-ekspresjonsvektor som koder for et antigenbindende domene og et CD3 $\zeta$ - polypeptid, og

b) omdanne nevnte T-PSC med CAR-ekspresjonsvektoren under betingelser slik at det produseres CAR-omfattende T-PSC (CAR-T-PSC).

8. Framgangsmåte ifølge krav 7, hvori nevnte CAR-ekspresjonsvektor omfatter et heterologt gen som koder for i det minste ett samstimulerende signaleringsområde eller en samstimulerende  
5 ligand.

9. Framgangsmåte ifølge krav 8, hvori

nevnte minst ett samstimulerende område omfatter et CD28-polyeptid, et 4-1BB-polyeptid, et OX40-polyeptid, eller et ICOS-polyeptid, et PD-1-polyeptid, et CTLA-4-polyeptid, et LAG-3 polyeptid, et 2B4 polyeptid, eller et BTLA polyeptid, og hvori

10 nevnte samstimulerende ligand er valgt fra gruppen bestående av CD80, CD86, CD70, OX40L, 4-1BBL, CD48, TNFRSF14 og PD-L1.

10. Framgangsmåte ifølge ett av kravene 7-11, hvori den pluripotente stamcellen ikke uttrykker TCR på celleoverflaten.

11. Framgangsmåte ifølge krav 7-9, i tillegg omfatter bryting av TCR-lokasjonen i den pluripotente  
15 stamcellen.

12. Framgangsmåte for framstilling av en T-celle som uttrykker en kimær antigenreseptor (CAR), hvilken framgangsmåte omfatter å,

a) framskaffe,

20 i) en pluripotent stamcelle som bærer en rearrangert T-cellereseptor (TCR)-lokasjon (T-PSCs), hvori den pluripotente stamcellen er avledet fra en T-celle, og

ii) en CAR-ekspresjonsvektor som koder for et antigenbindende domene og et CD3 $\zeta$ -polyeptid,

b) omdanne nevnte T-PSC med CAR-ekspresjonsvektoren under betingelser slik at det produseres CAR-omfattende T-PSC (CAR-T-PSC);

25 c) kultivere nevnte CAR-T-PSC under betingelser slik at det produseres en CAR-ekspresjon av T-PSC-avledet T-celle (CAR-T-PSC-avledet T-celle).

13. Framgangsmåte ifølge krav 12, hvori i c) kultiveringen av nevnte CAR-T-PSC under betingelser slik at det produseres en CAR-T-PSCs-avledet T-celle omfatter å:

(a) framskaffe,

30 i) nevnte CAR-T-PSC,

- ii) et første cellekultiveringsmedium for mesoderm induksjon,
  - iii) et andre cellekultiveringsmedium for hematopoietisk spesifisering og ekspansjon,
  - iii) et tredje cellekultiveringsmedium for T-lymfoid-differensiering, og
  - 5 iv) en feeder-cellelinje som induserer T-lymfoid-binding i hematopoietiske celler,
- (b) inkubere nevnte CAR-T-PSC med det første celle kultiveringsmediet i opptil omtrent 4 dager under betingelser som produserer en mesoderm celle,
- (c) inkubere den mesoderme cellen med det andre cellekultiveringsmediet i opptil omtrent 6 dager under betingelser som produserer og ekspanderer en hematopoietisk celle, og
- 10 (d) inkubere den ekspanderte hematopoietiske cellen og feeder-cellelinjen med det tredje cellekultiveringsmediet i minst omtrent 5 dager for å indusere T-lymfoidbinding i den ekspanderte hematopoietiske cellen for å produsere en CAR-ekspresjon av T-PSC-avledet T-celle.
14. Framgangsmåte ifølge krav 12 eller krav 13, hvori T-cellen er rettet spesifikt mot ett spesifikt
- 15 antigen og antigenspesifisitet for T-cellen er HLA-uavhengig.
15. Framgangsmåte ifølge krav 13 eller krav 14, hvori
- det første cellekultiveringsmediet omfatter knokkel-morfogent protein 4 (BMP-4) og basisk fibroblastvekstfaktor (bFGF),
  - det andre cellekultiveringsmediet omfatter vaskulær endotel vekstfaktor (VEGF), bFGF,
  - 20 stamcellefaktor (SCF), FMS-liknende tyrosin kinase 3-ligand (Flt3L), og minst ett Th1-cytokin, og hvori
- det tredje cellekultiveringsmediet omfatter SCF, minst én Th1 cytokin og Flt3L.
16. Framgangsmåte ifølge krav 15, hvori nevnte minst ett Th1-cytokin er valgt fra gruppen bestående av Interleukin-3 (IL-3), IL-15, IL-7, IL-12 og IL-21.
- 25 17. Framgangsmåte ifølge ett av kravene 12-16, omfatter videre d) eksponering av nevnte CAR-T-PSC-avledet T-celle for en antigen-presenterende celle under betingelser som stimulerer en aktivitet av nevnte CAR-T-PSC-avledet T-celle, hvori aktiviteten er valgt fra gruppen bestående av cytokin-utskilling, celledeling, cytotoxicitet og cytostatisk inhibering av cellevekst.
18. Framgangsmåte ifølge krav 17, hvori
- 30 nevnte cytokin er et Th1-cytokin valgt fra gruppen bestående av IFN- $\gamma$ , IL-2 og TNF- $\alpha$ , og

nevnte cytotoksitet bestemmes ved å drepe en målcelle som uttrykker et antigen som binder til nevnte CAR, og måle målcelledød.

19. Framgangsmåte ifølge ett av kravene 12-18, hvori CAR-ekspresjonsvektoren omfatter en nukleinsyresekvens som er integrert i CAR-T-PSC-genomet ved en genomisk sikker havnposisjon.